

重组人瘦素的基因构建、表达及活性鉴定

Gene Construction, Expression and Activities Analysis of Human Leptin

吴娜¹, 张长弓², 谢莲英¹, 王臻¹, 颜江华^{2*}WU Na¹, ZHANG Chang-Gong², XIE Lian-Ying¹, WANG Zhen¹ and YAN Jiang-Hua^{2*}

1 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

2 厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005

1 School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 Cancer Research Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 根据 NCBI 中公布的人瘦素 cDNA 序列, 设计并合成了 6 个 89bp 左右的 DNA 小片段, 经重叠延伸 PCR 扩增获得 464bp 的 rhLep 的完整基因片段。构建 pET22b(+)/rhLep 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达。目的蛋白以包涵体的形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 50% 以上。表达产物用 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 结果表明, 含 6 × His 标签的目的蛋白的相对分子量约 16kD。MTT 比色法实验显示, 当低剂量 (10 ~ 30ng/mL) 时, rhLep 具有促进内皮细胞生长的作用; 在高剂量 (50 ~ 225ng/mL) 时, rhLep 具有杀伤人内皮细胞的活性。其最大杀伤率达到 98.8%。吖啶橙荧光染色观察到高剂量 rhLep 对人内皮细胞有明显的凋亡作用。以上工作为进一步了解瘦素的体内体外生物活性奠定了基础。

关键词 瘦素, 基因构建, 表达, 细胞存活率

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0779-05

Abstract Six 89bp primers were designed on the base of the cDNA sequence encoding the human leptin reported on the NCBI. The synthetic gene with 464bp encoding rhLep was obtained by SOE (splicing by overlap extension) PCR. The expression vector pET22b(+)/rhLep was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3). The rhLep protein was expressed as inclusion bodies with the yield of more than 50% of total bacterial proteins after IPTG induction. The rhLep protein, which has a molecular weight about 16kD, was purified by Ni²⁺ affinity chromatography column and identified by SDS-PAGE. The MTT Assay shows that rhLep promotes EC304 cells growth at the low concentration of 10ng/mL to 30 ng/mL, and rhLep appears cytotoxic to EC304 cells with the high dose of 50ng/mL to 225ng/mL. The viability of EC304 cells decreases to 1.2% with the concentration of 225ng/mL of rhLep. The massive apoptosis of rhLep on EC304 cells is observed by AO-staining under fluorescent microscope. All these results would lay the foundation for the further study of its biological functions *in vitro* and *in vivo*.

Key words leptin, gene construction, expression, cell viability

自从 1994 年 Zhang^[1] 等通过位置克隆的方法克隆了小鼠的肥胖基因 (Obesity, ob) 及该基因人的同源序列, 从此拉开了研究与应用肥胖基因的序幕。瘦素 (Leptin) 是肥胖基因的表达产物, 主要在脂肪组

织中表达^[2]。人和大多数动物的瘦素前体是一个由 167 个氨基酸残基组成的球形蛋白, 由脂肪细胞合成后分泌入血的过程中水解去除 N-末端 21 个氨基酸组成的信号肽, 形成由 146 个氨基酸组成、分子量

Received: January 19, 2006; Accepted: June 19, 2006.

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-592-2186980; E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

为 16kD 的成熟瘦素分子^[3]。瘦素作为一种信号分子通过血脑屏障与下丘脑的特异受体结合,抑制神经肽 Y(NPY) 的合成与释放来实现调节体重^[4]。同时它也具有调节生长发育,调节炎症反应、免疫功能、维持正常的血脂代谢等功能^[5]。

近年来越来越多的研究资料表明,人体内的血清瘦素水平与乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、前列腺癌、脑瘤、脂肪瘤等的发生都有着一定的关系,血清瘦素浓度的升高与降低是癌症患者的一个重要的标志^[6]。Hu 等研究发现瘦素受体在乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、脂肪瘤等组织上均有表达^[7-9]。但瘦素在肿瘤发生过程中所起的生理、病理作用及调控机制仍未阐明,瘦素直接作用于肿瘤的研究仍然缺乏,本实验为了获得重组人瘦素(recombinant human Leptin,简称 rhLep)蛋白高表达的工程菌株,通过重叠延伸 PCR 获得 rhLep 全序列,构建了重组表达质粒 pET22b(+)/rhLep,并对在大肠杆菌中表达的蛋白进行了鉴定,为进一步研究瘦素对肿瘤的生物作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株和原核表达载体 pET22b(+) 购自 Novagen 公司;Pfu 及 Tag DNA 聚合酶、dNTP 购自 Promega 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Pfu DNA 聚合酶为 NEB 公司产品;质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品;Ni²⁺-Hi Trap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。引物由上海生工公司合成。EC304(人脐静脉内皮细胞株)由本室保存;培养于含 10% 新生牛血清、2mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基。

1.2 方法

1.2.1 重组人瘦素(rhLep)的基因构建:根据文献报道的全长人瘦素 cDNA(NM-000230),按照引物设计原则,根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则,在不影响氨基酸序列的前提下,将原序列中出现的稀有密码子核苷酸序列进行修改。以修改后的基因序列为模板,设计 6 条引物,并分别在引物 Lp1 和 Lp6 中引入 BamH 和 Xho 酶切位点,每条引物之间有 18 个碱基互补。经过四轮 PCR 将 6 个引物片段拼接成 rhLep 基因序列(464bp,包含酶切位点和保护碱基)。重叠 PCR 的每一步拼接反应如下:第一步 PCR 反应:将 Lp3、Lp4 拼接生成产物 Lp3

+4;第二步 PCR 反应:以 Lp3+4 为模板,Lp2、Lp5 为上、下游引物进行 PCR 扩增,得到产物 Lp2+5;第三步 PCR 反应:以 Lp2+5 为模板,Lp1、Lp6 分别为上、下游引物进行 PCR 扩增,得到产物 Lp1+6 即瘦素全长。反应条件均为:95 预变性 3min;95 变性 30s,53 退火 45s,72 延伸 1min,循环数 10;95 变性 45s,72 退火并延伸 90s,循环数 25;72 延伸 10min。6 个长引物片段基因序列设计如下:Lp1 CGTGA GCCATGGCCGTGCCGATTCAAAAAGTCCAGGATGACACCAAAACCCTCA TCAA GACAATTGTCACCCGTATCAATGACATTTACACACCGCAGTC; Lp2 CATTTCACACACGCA GTCA GTCTCCTCCAAAACA GAAA GTCACCCGGT TTGGACTTCA TTCCTGGCTCCACCCCA TCCTGACCTT AA GA; Lp3 CCATCCTGACCTTAA GCAAGATGGACC A GACACTGGCA GTCTACCAACA GATCCTCACCA GIATG CCTTCCCGTAAACGTTATCCAAATT; Lp4 CACGGCAA GTGGCAACTCTTA GA GAA GGCCA GCACGTGAA GAA GAT CACGGA GGTTTCAA GA TCGTTGAAATTTGGATAACG TTACG; Lp5 CCACCTCTGIACTGIAACCCTGTA GCTT CCA GGACACCCCCCA GGCTGTCCAA GGICTCCA GGCCA CTGGCCCATGGCAAATGGCAACTC; Lp6 ACAGTAC TCGA GGCACCCA GGGCTGA GGTCCA GCTGCCACA GCAT GTCCTGCA GA GACCCCTGAA GACGGCTCA GGGCCACCA CCTCTGIACTGTAAC。

1.2.2 重组表达质粒的构建及鉴定:PCR 产物及质粒分别用限制性内切酶 BamH 和 Xho 消化,胶回收。用 T4 DNA 连接酶将 rhLep 基因克隆至质粒 pET22b(+) 中,构建成重组质粒 pET22b(+)/rhLep,转化 E. coli BL21(DE3)。重组子提取质粒进行双酶切鉴定,阳性克隆送上海英俊公司测序。

1.2.3 表达和纯化:挑含测序正确的重组质粒 pET22b(+)/rhLep 的 E. coli BL21(DE3) 单菌落,37 振荡培养过夜,按 1:100 稀释到 LB 培养液中,37 振荡培养至 OD_{600nm} 值约为 0.5 时,加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6h。目的蛋白的纯化参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的 Ni 柱蛋白纯化操作手册进行。采用透析法复性。12% 的 SDS-PAGE 及 BIO-RAD 凝胶成像系统(Quantity One-4.6)分析表达量与纯度。

1.2.4 MTT 比色法^[10]测定不同 rhLep 浓度下人内皮细胞存活率:取对数生长期 EC304 细胞,消化后悬浮在一定量的培养液中,计数后调整细胞浓度,按 500 细胞/200μL/孔接种在 96 孔板,置 37℃,5% CO₂,饱和湿度条件下培养。24h 细胞贴壁后,吸去

培养液,换成含不同 rhLep 浓度的培养液,继续培养 6h,每孔加入 5mg/mL MTT 0.02mL,继续培养 4h,吸去培养液,加入 0.2mL DMSO,震荡 5 min,继续培养 30min,用酶标仪测 A_{570nm}。计算细胞存活率:细胞存活率 = 各 rhLep 浓度下吸光度(A)值/正常对照组吸光度(A)值。

1.2.5 吖啶橙染色形态观察:取对数生长期 EC304 细胞,以每孔 3.0 × 10⁵个接种于 6 孔板中,培养 12h 后加入终浓度为 225ng/mL 的 rhLep。12h 后,离心收集细胞,用 PBS 清洗 2 次,加入质量分数为 0.15% 的 KCl

溶液 500μL,室温静置 15min,离心去上清液,向沉淀中加入体积分数为 4% 的多聚甲醛 100μL,4 固定 10 min。将细胞打匀,吸约 95μL 滴于载玻片上,待固定液挥发干后,加 5μL 0.025%吖啶橙醋酸染液于细胞上,盖上盖玻片,将荧光显微镜的激发光调至蓝光(502),观察细胞核形态并照相。

2 结果

2.1 重组人瘦素(rhLep)的基因构建

图 1 的 1~3 泳道中分别可见 160bp、320bp、464bp 左右的产物带,均与理论计算的片段大小相一致。

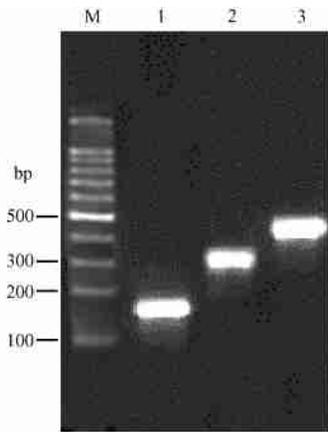


图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 1.7% Agarose gel electrophoresis of PCR
M:DNA markers;1:Lp3+4;2:Lp2+5;3:Lp1+6(rhLep).

2.2 重组质粒的鉴定

重组子提取质粒经 BamH 及 Xho 酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定,如图 2 所示,得到两条目的条带,分别为 rhLep 条带(464bp)、pET22b(+)条带(5482bp)。阳性克隆送上海英骏公司测序,测序结果表明获得一正确序列的重组子。

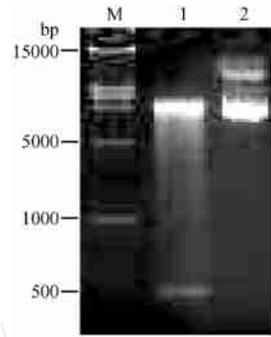


图 2 重组 pET22b(+)/rhLep 质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant pET22b(+)/rhLep

1:pET22b(+)/rhLep digested by BamH and Xho ;2:pET22b(+)/rhLep:M:DNA Mrkers.

2.3 rhLep 的表达及纯化^[11]

含重组质粒 pET22b(+)/rhLep 的 E. coli BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后,目的蛋白主要以包涵体形式表达,表达量占菌体总蛋白的 50% 以上。包涵体经尿素洗涤和溶解后,通过 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化。图 3 所示,在 16kD 附近有一特异条带,与目的蛋白的理论推算的相对分子量(约 16.8 kD)相符,其纯度达 95% 以上(Quantity One-4.6)。

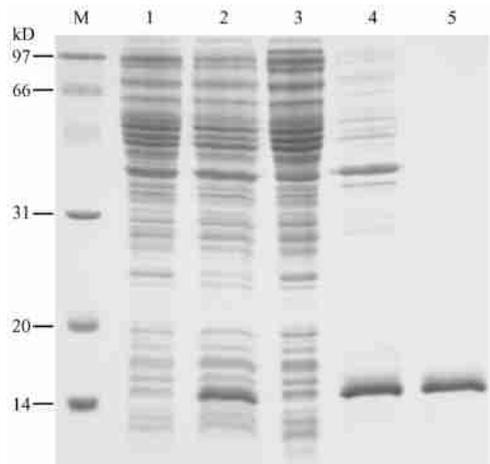


图 3 rhLep 表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression and purity of rhLep proteins

1: the lysates of E. coli cells with blank vector pEF22b(+);
2: cells after IPTG induction; 3: cell supernatant after ultrasonic; 4: total insoluble protein; 5: purified protein M. protein markers.

2.4 不同浓度 rhLep 蛋白对 EC304 生长的影响

如图 4 所示,在 rhLep 浓度小于 30ng/mL 时,EC304 细胞的存活率与正常对照培养基相比明显升高。rhLep 浓度为 50ng/mL 时,细胞存活率轻微下降,随着培养基 rhLep 浓度增高,当培养基 rhLep 浓度为大于 100ng/mL 时,细胞存活率下降显著。

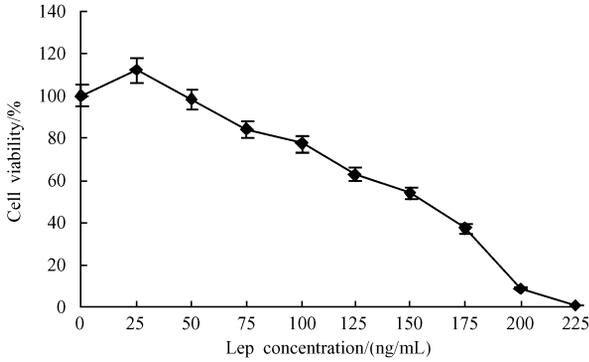


图4 不同浓度 rhLep 蛋白对 EC304 细胞存活率的影响

Fig. 4 The effects of different rhLep concentration on the viability of EC304 cell

200ng/mL、225ng/mL 浓度下细胞存活率分别为 9 % 和 1.2 %。结果显示,低浓度 Leptin(30ng/mL) 可以促进内皮细胞生长,当其浓度高于 50ng/mL 时,便可抑制内皮细胞生长,使内皮细胞发生凋亡。

2.5 细胞核变化的检测

图 5 中所示空白对照组细胞胞膜完整,胞质丰富饱满。而处理组可见部分细胞胞膜皱缩,细胞核发生固缩,核质沿核膜浓缩边集,可见致密强荧光,有的细胞核碎裂,形成凋亡小体,呈现典型的凋亡形态特征。说明高浓度瘦素可使内皮细胞发生凋亡。

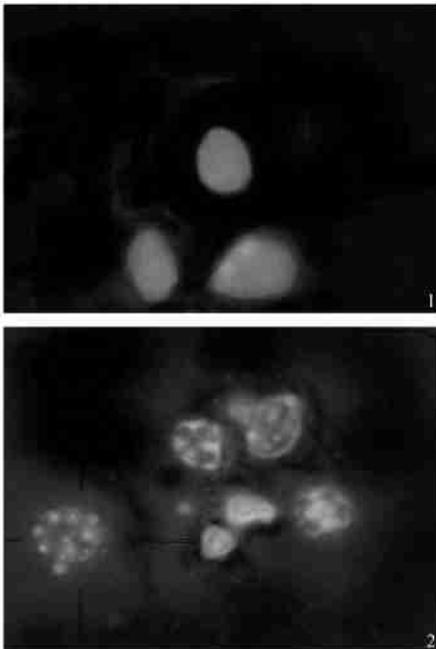


图5 经 rhLep 处理的 EC304 细胞吖啶橙荧光染色图(×40)

Fig. 5 Photographs of AO-Stained EC304 cells after treated by rhLep (×40)
1: control (PBS); 2: rhLep 225ng/mL.

3 讨论

真核基因在大肠杆菌(*E. coli*)中表达,目前已成为重组 DNA 技术中一种必不可少的研究手段。但是,外源真核基因在大肠杆菌中的表达量往往受到诸多因素的制约。其中一个重要的因素是当外源真核基因中含较多的 *E. coli* 中低频率使用的稀有密码子时会影响蛋白的翻译速率,从而影响表达效果。本实验考虑到这一因素,以 GenBank 公布的人 leptin cDNA 序列为依据,去除 N 端 21 个信号肽序列,根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则,在不影响氨基酸序列的前提下,将原序列中出现的稀有密码子核苷酸序列进行修改。以修改后的基因序列为模板,设计引物,重叠延伸 PCR 拼接成完整的瘦素基因序列。经测序证实与 GenBank 中的人 leptin 编码的 164 个氨基酸序列一致,阅读框完全正确。为以后的瘦素在大肠杆菌中高效表达的研究奠定了很好的基础。本实验采用的表达载体 pET22b(+) 由 T7 强启动子调控外源基因的表达,具有 N-端 *pelB* 信号肽序列,能将外源蛋白转运到周质空间,且蛋白的 C 端有 (His)₆ tag,便于下游纯化。蛋白表达采用 IPTG 诱导,本文中所采取的诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度均经优化确定。发现基因产物以包含体形式表达,包含体中目的蛋白的浓度、纯度高,有利于抵御宿主菌蛋白酶的毒性。经 SDS-PAGE 电泳显示在分子量 16kD 附近有明显表达条带,与基因编码的理论推算值相符。经 Ni²⁺ 亲和层析柱进行纯化后表达蛋白的纯度达 95 %。

Nakata^[12]、Maruyama^[13] 等研究发现瘦素长型,短型受体在内皮细胞上均有表达,并报道了关于低剂量瘦素可以促进内皮细胞生长,高浓度瘦素便可抑制内皮细胞生长。本实验通过研究了不同浓度 rhLep 蛋白对 EC304 生长的影响,实验表明:当浓度低于 30ng/mL 时,瘦素可以促进内皮细胞生长;但当瘦素浓度高于 50ng/mL 时,内皮细胞存活率明显下降;而瘦素浓度为 225ng/mL 时内皮细胞存活率只有 1.2 %,且在荧光显微镜下观察到许多细胞有典型的凋亡形态学改变,并可见凋亡小体。这说明瘦素可以快速有效地杀伤内皮细胞且呈剂量依赖性。这一研究结果又再次证实了 Nakata、Maruyama 等的研究报道。众所周知内皮细胞对肿瘤的生长繁殖起着至关重要的作用。本实验成功地构建了瘦素蛋白高表达的工程菌株并获得了具有生物活性的瘦素蛋白。

这为进一步研究瘦素对内皮细胞和肿瘤细胞的生物学作用奠定了基础,为将瘦素应用于肿瘤临床治疗^[14]研究提供了可能性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang Y, Ricardo P, Margherita M *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, **372**: 425 - 432
- [2] Friedman JM. The alphabet of weight control. *Nature*, 1997, **385**: 119 - 120
- [3] Offer BJ, Heller RS, Leech CA *et al.* Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Diabetes*, 1997, **46**: 1087 - 1093
- [4] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K *et al.* Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1625
- [5] Laud K, Gourdou I, Pesseme L *et al.* Identification of leptin receptors in human breast cancer: Functional activity in the T47-D breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, **188**: 219
- [6] Ponnandai Somasundar MD, David W. McFadden M D, FACS *et al.* Leptin is a growth factor in cancer. *Journal of Surgical Research*, 2004, **116**: 337 - 349
- [7] Lia Z, Vesaka T, Watanabe H *et al.* High fat diet enhances colonic cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin. *Int J Oncol*, 2001, **19** (5): 1009 - 1014
- [8] Smith JT, Waddell BJ. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: Peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J Endocrinol*, 2003, **176**: 313
- [9] Arpaci F, Yilmaz MI, Ozet A *et al.* Low serum leptin level in colon cancer patients without significant weight loss. *Tumor*, 2002, **88**: 147
- [10] Chen T(陈婷), Yun Q(袁强), Bi JX(闭静秀) *et al.* Separation and Purification of PEGylated rhGCSF by two-step ion-exchange chromatography. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21** (2): 284 - 288
- [11] Yu R(余蕊), Li SC(李世崇), Wu BC(吴本传) *et al.* Expression, Identification and bioactivity Characterization of an anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21** (2): 289 - 293
- [12] Nakata M, Yada T, Soejima N *et al.* Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes*, 1999, **48** (2): 426 - 429
- [13] Aruyama, Ikuro. Leptin Promotes Aggregation of Human Platelets via the Long Form of Its Receptor. *Diabetes*, 1999, **2** (1): 998 - 1001
- [14] Huang X, Møllema G, King, Thorpe *et al.* Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 1997, **275**: 574 - 570

重 要 通 知

《生物工程学报》2006 年出版英文版

为了加快期刊的国际化进程,扩大国际交流,本刊与国际知名的出版公司爱思唯尔(Elsevier)达成协议,合作出版英文版《Chinese Journal of Biotechnology》(电子版),该刊与中文版同步,双月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络平台上(我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>)。

爱思唯尔是国际著名的出版公司,《细胞》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界上最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台,将可以大大地提高文章的浏览量,扩大期刊及作者在国内外的影响,提高文章的被引频次。同时,出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍,使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

本刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等,范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等,涉及生物技术各个领域,非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的,也将同时以中文形式发表在中文印刷版上。英文版不再另收版面费。

具体做法是:每期从中文版中精选出 10 篇稿件译成英文,凡具备以下条件之一者即可入选:1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展,达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文,经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工,再返回作者进行内容确认。

投稿时请注意以下事项:1. 稿件撰写时,应力求叙述清楚,避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点,用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释,使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息,请登录我刊网站(journal.im.ac.cn/cjb)点击“英文版”,或直接联络编辑部:

电话/传真:010-62554303

E-mail: cjb@im.ac.cn